



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26326 (13) C1
(51) A 61 K 38/57, A 61 K 91/02, A 61 K 9/06,
A 61 K 9/08ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ВІРУСНОЇ ТА БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕтіОЛОГІЇ У ЛЮДИ-
НИ І ТВАРИНИ ТА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЙОГО РЕАЛІЗАЦІЇ

1

(20) 93005172 (09.04.93)
(21) 4743095
(22) 26.05.88
(24) 30.08.99
(86) PCT/US88/01785 (26.05.88)
(46) 30.08.99. Бюл.№5
(56) Машковский М.Д. Лекарственные средства. Ч.2.-М.: Медицина, 1987, с. 385.
(72) КІЧКА Вітольд (US)
(73) НІКА ХЕЛТ ПРОДАКТС ЛІМІТЕД (LI)
(57) 1. Способ лечения заболеваний вирусной и бактериальной этиологии у человека и животного, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей активное начало и фармацевтически приемлемые носители, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что используют композицию, содержащую в качестве активного начала димер лизоцима или димер рибонуклеазы А, причем доза активного начала составляет 0,01-50 мг/кг массы тела.

2. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что активное начало содержится в композиции в концентрации 0,0001-2,0 мас. %.

3. Способ по п.2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанную композицию вводят орально.

4. Способ по п. 1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанную композицию применяют местно, предпочтительно в виде мази, содержащей в качестве носителя воду, парафин и пропиленгликоль.

5. Способ по п.4, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что включает лечение герпеса, по крайней мере, одного из группы, представляющей герпес простой, опоясывающий лишай и генитальный герпес.

6. Способ по п.4, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что включает лечение ран и/или вагинальных инфекций.

2

7. Способ по п. 1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанную композицию вводят внутривенно, предпочтительно в виде раствора физиологически приемлемой соли, более предпочтительно в виде водного 0,5-1,5%-ного раствора соли с содержанием димера около 4 мг/мл.

8. Способ по п.1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что композицию вводят в виде физиологически приемлемого раствора соли, предпочтительно в виде водного 0,5-1,5%-ного раствора для лечения отитов путем закапывания.

9. Способ по п.1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что композицию вводят в виде суппозиторий предпочтительно для лечения вагинальных инфекций.

10. Способ по п.1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что включает лечение мастита или кожных заболеваний.

11. Способ по п.1 или 2, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что включает лечение собачьего парвовируса.

12. Композиция для лечения заболеваний вирусной и бактериальной этиологии у человека и животного, включающая активное начало и физиологически приемлемые носители, о т л и ч а ю щ а я с я тем, что включает в качестве активного начала димер лизоцима или димер рибонуклеазы А в количестве 0,0001-2,0 мас. %, предпочтительно 0,01-0,5 мас. %.

13. Композиция по п.12, о т л и ч а ю щ а я с я тем, что фармацевтически приемлемым носителем является физиологически приемлемый раствор соли, предпочтительно водный 0,5-1,5%-ный раствор соли, более предпочтительно с содержанием димера около 4 мг/мл для

(19) UA (11) 26326 (13) C1

орального, местного и/или внутривенного введения.

14. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что содержит около 0,8 мг димера лизоцима на 1 мл физиологически приемлемого раствора соли для лечения отитов путем закапывания.

15. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что представляет собой мазь, содержащую около 4 мг димера или указанных димеров на около 35 мг, по крайней мере, одного соединения, выбранного из группы, состоящей из парафина, ацетилстеароилоксиспирта, около 10 мг пропиленгликоля и 200 мл воды.

16. Композиция по п.13 или 15, отличающаяся тем, что предназначена для лечения герпеса, по крайней мере одного из группы, представляющей герпес простой, опоясывающий лишай и генитальный герпес.

17. Композиция по п.15, отличающаяся тем, что включает около 4-

20 мг димера или димеров на 1 мл мази для лечения ран и кожных заболеваний.

18. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что включает около 4-20 мг димера или димеров на 1 мл физиологически приемлемого раствора соли для лечения вагинальных инфекций.

19. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что представлена в форме суппозитория, предпочтительно содержащего около 5 мг на 1 мл фармацевтически приемлемой основы суппозитория, для лечения вагинальных инфекций.

20. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что предназначена для лечения мастита и/или кожных заболеваний, вызванных бактериальными или вирусными инфекциями.

21. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что предназначена для лечения парвовируса.

Изобретение относится к новым анти-вирусным и антибактериальным составам, включающим полимеризованные ферменты вместе с фармацевтически приемлемым носителем, и способу их употребления.

Всегда растущее количество бактериальных линий и вирусных болезней, которые устойчивы к антибиотикам, сделали необходимым введение новых видов лекарств для обработки животных и людей. Среди множества существующих лечебных составов и лекарств было известно использование ферментов в мономерной форме с целью обеспечения терапевтического эффекта на пациентах, страдающих различными болезнями. Ферменты являются каталитически активными белками, которые осуществляют практически все жизненные процессы в организмах. Таким образом, многие ферменты либо индивидуально, либо в некоторых комбинациях были выделены исходя из их физико-химического, физиологического или биологического эффекта.

Среди различных ферментов, для которых был отмечен определенный терапевтический эффект, находятся лизоцим и рибонуклеаза. Лизоцим известен с 1922 года, когда он был открыт Флемингом.

Только после 1950, однако, были выявлены ферментативные функции лизоцима. С этого времени соединение являлось объектом интенсивных физико-химических, физиологических и клинических исследований, но степень биологической значимости соединения все еще требует определения. Так, лизоцим, как было показано, имеет различные терапевтические свойства, такие как антивирусное, антибактериальное, противовоспалительное и антигистаминное. Антибактериальный эффект, судя по всему, основан на гидролизе бета-1,4-гликозидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, содержащимися в бактериальной стенке.

Присутствие лизоцима в фагоцитных клетках также хорошо документировано. Исследования в этой области показали, что внутриклеточный лизоцим, содержащийся в лизосомах, способен к перевариванию фагоцитированных бактерий. У людей была показана стимуляция фагоцитоза лизоцимом в физиологических концентрациях 10-400 мг/мл.

Описаны также другие свойства лизоцима. Например, судя по всему, лизоцим снижает температуру тела в процессе инфекции, когда температура является отве-

том на эндогенные пирогены, высвобождаемые токсинами. Также представляется, что лизоцим участвует в иммунологических процессах, стимулируя синтез гамма-глобулинов, опсонинов и других антител. Более того, предполагается, что лизоцим имеет сильный противовоспалительный эффект. Несмотря на эти известные положительные свойства лизоцима, несмотря на множественные проекты исследований и производство фармацевтических составов, основанных на лизоциме, применение этого фермента для терапевтических целей сильно ограничено.

Другая группа ферментов, которая была исследована из-за их различных биологических эффектов, — рибонуклеазы. Это группа ферментов, неизменно обнаруживаемых во многих животных и растительных организмах, так же, как и в клетках бактерий. Изучение их свойств и исследования способов выделения были начаты в 1955 г. Шмидтом и МакДональдом. Среди многих открытий, основанных на этом ферменте, было обнаружено, что в раковых тканях активность рибонуклеаз значительно снижена. Например, было обнаружено, что лейкемогенные вирусы радикально снижали активность кислой рибонуклеазы у мышей. Также для мышей с вирусной лейкемией было обнаружено существенное снижение активности кислой рибонуклеазы в митохондриальной и микросомальной фракциях ткани селезенки из этих животных.

Исследования, отмеченные выше, приводят на мысль о том, что уменьшение активности рибонуклеазы как-либо тесно связано с инфекциями, вызываемыми вирусом. Поэтому было предположено, что рибонуклеазные ферменты могут проявлять некоторую антивирусную активность. Опять же, однако, в настоящее время не существует известных сообщений о приготовлении составов, использующих этот фермент в качестве антивирусного агента.

Одна из основных причин, по которой потенциально выигрышные ферменты до сих пор широко не используются в их терапевтических эффектах, заключается в наблюдавшемся цитотоксическом эффекте мономерных форм этих и других ферментов. В тестах на культивируемых фибробластах цитотоксический эффект наблюдался как от лизоцимных, так и от рибонуклеазных мономеров даже при очень небольших количествах. Ясно, потенциально выигрышные эффекты от этих и других ферментов могут быть достигнуты, если будет разработан эффективный способ

борьбы с их цитотоксическими эффектами. Желательно, следовательно, разработать составы, основанные на лизоциме, рибонуклеазе или других сходных ферментах, которые могут быть эффективно использованы для обработки вирусных или бактериальных болезней или других болезненных состояний без цитотоксических эффектов, обычно наблюдаемых при применении ферментов в мономерной форме.

В согласии с настоящим изобретением было обнаружено, что антивирусный или антибактериальный состав, имеющий в качестве активного составляющего лизоцим, рибонуклеазу или другие ферменты, кроме того, не проявляющий цитотоксических эффектов, может быть приготовлен с использованием димерных форм ферментов. Путем приготовления составов с использованием в качестве активных составляющих димеров лизоцима или рибонуклеазы и фармацевтически приемлемого носителя ряд инфекционных болезней может быть с успехом вылечен без заметных цитотоксических эффектов.

Антивирусные и антибактериальные составы настоящего изобретения могут быть приготовлены сначала путем получения лизоцима и рибонуклеазы в их мономерной форме. Мономеры лизоцима (каталожный номер 28260) и мономеры рибонуклеазы (каталожный номер 34388), использованные при получении составов в соответствии с настоящим изобретением, были получены от Serva Feine Biochemica, GmbH und Cooperation, D-69-000 Heidelberg. Эти мономеры ферментов могут быть полимеризованы в димеры любым общепринятым методом. Однако несколько предпочтительна полимеризация ферментов, выработанная и раскрытая в Carlsson et al., *Biochemistry Journal* 173 : 723-737 (1978). Прочие методы, такие как описан в Sorrentino et al., *Eur.J.Biochem.* 124 : 183-9 (1982), также могут быть использованы. Было также обнаружено, что определенно полезный димер рибонуклеазы, который может быть применен в составах настоящего изобретения, — димер, приготовленный из панкреатической рибонуклеазы А, выделенной из тканей поджелудочной железы животного.

Было обнаружено, что составы, содержащие в качестве активного ингредиента димер лизоцима или рибонуклеазы и фармацевтически приемлемый носитель, эффективны в лечении ряда бактериальных и вирусных болезней без нежелательных цитотоксических эффектов. Эти

потенциально вредные эффекты ферментов были тестированы при сравнительном изучении с использованием как мономерных, так и димерных форм лизоцима и рибонуклеазы. В этих исследованиях культуры фибробластов почки зеленой мартышки обрабатывали различными концентрациями мономеров и димеров лизоцима и рибонуклеазы. Было показано, что мономер лизоцима доказал свою цитотоксичность в отношении фибробластов после 24 ч при концентрациях 0,1 и 1,0 мг/мл. После 3 дней инкубации цитотоксический эффект в отношении фибробластов наблюдался даже при концентрации 0,01 мг/мл, которая поражает 50% инкубированных клеток. После 5 дней 75% культивированных клеток были поражены цитотоксической активностью мономера лизоцима в концентрациях 1,0 и 0,1 мг/мл. Для сравнения, димер лизоцима продемонстрировал отсутствие цитотоксического эффекта при всех концентрациях, использованных в этих тестах, даже после периода в 7 дней. Эти исследования показали, что димерная форма лизоцима приблизительно в 100 раз менее токсична по отношению к фибробластам почки зеленой мартышки (GMK), чем мономерная форма.

Исследования в отношении рибонуклеазы показали сходную потерю цитотоксического эффекта димерной формой. При исследовании рибонуклеаза доказала свою цитотоксичность на фибробластах GMK в 5-дневной культуре при концентрациях столь низких, как 0,0001 мг/мл. После 7 дней культивирования цитотоксические эффекты рибонуклеазных мономеров при концентрациях 0,01 мг/мл и выше элиминировали 100% культивированных клеток. В противоположность, димер рибонуклеазы не показал цитотоксического эффекта на фибробластах GMK при всех концентрационных уровнях даже после 7-дневной инкубации. Димерная форма рибонуклеазы, таким образом, по наблюдениям приблизительно в 1000-10000 раз менее токсична по отношению к фибробластам, чем мономерная форма. Эти тесты ясно показывают, что цитотоксические эффекты, которые обычно сопровождают использование мономерных форм таких ферментов, как лизоцим и рибонуклеаза, могут быть эффективно устранены, если использовать эти ферменты в их димерных формах.

Дальнейшее исследование показало, что несмотря на потерю заметных цитотоксических эффектов, лизоцим и рибонуклеаза в их димерной форме могут быть

необычайно эффективны при лечении вирусных и бактериальных эффектов. В опытах с использованием оплодотворенных куриных яиц и линии вируса Sendai димер лизоцима интраамниотически инъецировали в яйца в различных концентрациях. В каждое яйцо также было инъецировано 2 единицы вируса Sendai. После инкубации амниотическую и аллантоисную жидкости собирали из инфицированных и контрольных яиц и сравнивали. Эти тесты показали, что димер лизоцима способен подавлять репликацию вируса Sendai, культивированного в 10-дневных оплодотворенных куриных яйцах, даже в концентрациях столь низких, как 0,01 мг/мл. Сходные тесты с использованием димеров лизоцима и рибонуклеазы продемонстрировали бактериостатический эффект этих димерных ферментов на линиях бактерий *Streptococcus*.

Составы, приготовленные из димеров лизоцима и рибонуклеазы в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, могут быть использованы для лечения ряда вирусных и бактериальных инфекций. Составы могут быть приготовлены в различных формах, и применение этих составов фермент-носитель может быть осуществлено внутренне или наружно для конкретного человеческого или животного пациента в зависимости от болезни, нуждающейся в излечении. Для внутренних инфекций, таких как инфекция уха, мастит, инфекции желудка или вагинального тракта, димерные составы изобретения могут быть удобно приготовлены и применены орально, внутривенно, парентерально, через суппозитории или любым другим способом, который позволит димерному раствору достигнуть инфицированной области. Для внешних заболеваний, таких как вирусные или бактериальные болезни кожи, инфицированные раны, герпесные или другие половые болезни с внешними эффектами, составы изобретения могут быть применены поверхностно на пациенте в любой из разнообразия удобных форм.

Конкретная природа болезни или инфекции, требующей излечения, таким образом, определяет подходящую форму состава данного изобретения. Для внешних обработок состав может быть применен в таких разнообразных формах, как мази, лосьоны, растворы, масла и т.д. Когда необходимо внутреннее применение, может быть применен ряд таких удобных форм, как капли, таблетки, растворы, капсулы, зубные порошки и т.д. Конкретная

форма состава также определяет природу фармацевтически приемлемого носителя, использованного в составе с димером фермента. Среди многих удобных носителей, которые могут быть использованы, — гидрофильные основания, физиологически приемлемые растворы соли, вода, мази, порошки и т.д.

Энзиматическое лечение вирусной или бактериальной инфекции без цитотоксических эффектов, таким образом, обеспечивается в настоящем изобретении применением к человеческому или животному пациенту эффективного количества димерного состава, обсужденного выше. Под эффективным количеством понимается количество, которое необходимо для произведения антивирусного или антибактериального эффекта. Количество, необходимое для эффективного лечения, варьирует, завися в каждом случае от природы излечиваемой болезни и формы применяемого димерного состава. В общем состав настоящего изобретения применяется при уровне дозы 0,01–50,0 мг/кг веса тела с конкретно предпочтительным интервалом 1,0–2,0 мг/кг веса тела. В случае внешних обработок мази, приготовленные с использованием приблизительно 200 мл раствора из воды, парафина и пропиленгликоля, были эффективны при использовании 4–5 раз в день. Дозовые уровни в этих пределах достаточны для лечения ряда вирусных или бактериальных болезней без вредных цитотоксических эффектов, которые могут сопровождать лечение ферментными мономерами.

Следующие примеры приведены лишь как иллюстрации настоящего изобретения и не направлены на ограничение его области.

Пример 1. Проводилось сравнительное исследование касательно цитотоксического эффекта мономеров и димеров лизоцима и панкреатической рибонуклеазы А на культуре фибробластов почки зеленой мартышки (GMK). Эти тесты проводились путем обработки культуры фибробластов мономерами и димерами в концентрациях от 0,0001 до 1,0 мг/мл. Затем культуры инкубировали 7 дней, после чего культуры проверяли на цитотоксичность. Результаты этих тестов приведены в табл. 1 и 2.

Как можно видеть из табл. 1, мономер лизоцима доказал свою цитотоксичность после 24 часов при концентрациях 0,1 и 1,0 мг/мл. После трех дней инкубации мономер продемонстрировал цитотоксические эффекты на фибробластах даже

при концентрации 0,01 мг/мл, поражая 50% инкубированных клеток. После 5 дней 75% культивированных клеток были поражены цитотоксической активностью мономера лизоцима при концентрациях 1,0 и 0,1 мг/мл.

В противоположность, димерная форма лизоцима показала отсутствие цитотоксического эффекта в любой из использованных концентраций даже после завершения 7-дневной инкубации. Исследования, таким образом, показали, что димер лизоцима оказался примерно в 100 раз менее токсичен по отношению к фибробластам GMK, чем мономер лизоцима.

Как можно видеть из табл. 2, мономер панкреатической рибонуклеазы А оказался цитотоксичным по отношению к фибробластам GMK в 5-дневной культуре даже при таких низких концентрациях как 0,0001 мг/мл. После 7 дней культивирования цитотоксический эффект панкреатической рибонуклеазы А при концентрации 0,01 мг/мл и выше был достаточно силен для элиминирования 100% культивированных клеток.

Сходным образом с димером лизоцима димерная форма панкреатической рибонуклеазы А продемонстрировала отсутствие цитотоксического эффекта на фибробластах GMK при всех концентрациях, использованных в тесте, в течение 7-дневного периода. Результаты, таким образом, указывают, что димер панкреатической рибонуклеазы А примерно в 100–10000 раз менее токсичен по отношению к фибробластам GMK, чем мономер панкреатической рибонуклеазы А.

Пример 2. Димер лизоцима был изучен в отношении антивирусных эффектов. В экспериментах димер лизоцима инъецировали в 10-дневные оплодотворенные куриные яйца в концентрациях 10,0 мг/мл, 1,0 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл. Линия вируса Sendai (гемагглютининовый титр = 1:128 HA) была добавлена к каждой концентрации димера в количестве двух гемагглютининовых единиц. После введения димера лизоцима и вируса яйца инкубировали 72 ч при 37°C. После инкубации амниотическую и аллантоисную жидкости собирали из инфицированных яиц и подвергали гемагглютининовому тесту при помощи микрометодов с использованием набора Takatsu и кровяных телец курицы. Затем эксперименты повторяли. Результаты, полученные в этих опытах, представлены в табл. 3. Как можно видеть из табл. 3, димер лизоцима ингибирует репликацию вируса

Sendai, культивированного в 10-дневных оплодотворенных куриных яйцах, даже при столь низких концентрациях как 0,01 мг/мл.

Тесты были проведены на линии вируса Sendai. Гемагглютининовый титр вируса составлял 1:128 НА.

В качестве экспериментальной модели служили 10-дневные оплодотворенные куриные яйца.

Одинаковое количество Sendai-2 гемагглютининовые единицы – добавляли к каждой концентрации димера лизоцима. В то же самое время был начат контрольный тест на лизоцимовом димере с целью выявить, имеет ли он гемагглютинационные свойства – результаты были отрицательными. Последовательные концентрации димера лизоцима плюс 22 единицы НА вируса были затем использованы для интраамниотического заражения 4 куриных яиц. Яйца затем инкубировали 72 ч при 37°C.

После периода инкубации амниотическую и аллантоисную жидкости собирали из инфицированных яиц. Проводили гемагглютининовый тест (гемагглютинационный микрометод) с использованием тестового набора Takatsu и красных кровяных телец курицы.

Пример 3. Влияние димерных форм лизоцима и панкреатической нуклеазы А на бактерии тестировали на нескольких патогенных линиях, собранных от коров с маститом. Эффекты различных концентраций димера лизоцима на три линии (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* и *S. liberis*) в табл. 4. Эти результаты теста демонстрируют, что все три линии стрептококков оказались чувствительны к активности димера лизоцима. Это наиболее показательно в случае *S. liberis*, который был поражен активностью димера при концентрации столь низкой, как 1,25 мг/мл. Бактериостатические эффекты на других линиях стрептококков наблюдались при концентрациях начиная примерно с 10 мг/мл.

В табл. 5 представлены эффекты димера панкреатической рибонуклеазы А и димера на линии патогенных бактерий, выделенных от человеческих пациентов. Как видно из табл. 5, димер панкреатической рибонуклеазы А был наиболее эффективен на бактериальных линиях *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Proteus vulgaris*, а именно в концентрациях начиная приблизительно с 5 до 10 мг/мл. Бактериальные линии стафилококков и стрептококков, как оказалось, чувствительны к димеру лизоцима также при

концентрациях приблизительно 5-10 мг/мл. Тесты на чувствительность проводились в соответствии с общепринятыми принципами, рекомендованными ВОЗ.

Пример 4. Влияние димера лизоцима и панкреатической рибонуклеазы А на пролиферацию линий эритролейкемических клеток K-562 определяли, обрабатывая клетки этих линий различными концентрациями димеров. Результаты этих тестов представлены в табл. 6 и 7. Коротко, все концентрации димера лизоцима, использованные в эксперименте, показали сильный цитопатогенный эффект на клетках K-652. В дополнение, как видно из табл. 7, димер панкреатической рибонуклеазы А также имеет сходное влияние на эритролейкемическую линию клеток, но только при концентрации 1,0 мг/мл.

Пример 5. Влияние димера лизоцима на среды гнойных отитов было изучено. Исследование было проведено с использованием 19 собак различных пород с разными формами болезни. Болезнь характеризовалась воспалительным процессом, который в среднем продолжался приблизительно 7-14 дней, но в одном случае длился 9 месяцев. У 7 собак гнойное отделяемое из воспаленного уха было исследовано для определения бактериальных линий в нем перед тем, как исследование было предпринято. Эти тесты по культивированию продемонстрировали присутствие стафилококков, синегнойной палочки, *Pseudomonas aeruginosa*, *Coccidia species* и различных видов бактерий.

Пораженные собаки проявляли различные признаки того, что им больно, такие как мотание головой и попытки достать инфицированное ухо лапами. Собаки в общем имели пониженный аппетит и повышенную температуру (39,2 - 41,2°C). 18 собак не получали никакого предварительного лечения какими бы то ни было фармацевтическими средствами. Одна собака, у которой инфекция продолжалась 9 месяцев, получала несколько антибиотиков, но они были неэффективны при лечении данного состояния.

Собак лечили составом настоящего изобретения, который состоял из раствора 20 мг лизоцима и 25 мл физиологической соли. Состав был применен в форме капель. 10 капель помещали в воспаленное ухо 4-5 раз в день. После 1-го дня лечения всегда наблюдалось заметное улучшение: температура падала, собаки, судя по всему, чувствовали себя более комфортно и имели лучший аппе-

тит. Симптомы гнойного воспаления полностью исчезали между 3 и 6 днями лечения. У собаки, которую перед этим безуспешно лечили антибиотиками 9 месяцев, успешное подавление болезни было достигнуто после 10 дней. Таким образом было показано, что димер лизоцима эффективен при лечении гнойных отитов у собак.

Пример 6. Исследовалось влияние димера лизоцима на коров с маститами. В исследовании было использовано 6 коров с маститами. Эти коровы демонстрировали такие признаки болезни, как температура выше 40,5°C и пониженный аппетит. Во всех 6 случаях лечение началось на второй день болезни. Перед применением составов были собраны образцы молока для бактериальных исследований. Оказалось, что культура содержит такие микробы, как стафилококк и *Streptococcus agalactiae*.

Димер лизоцима вводился каждой корове инъекцией шприцем в инфицированные соски в дозах по 40 мг в растворе 50 мл физиологической соли дважды в день. Было обнаружено, что после всего лишь 24 ч температура тела была снова нормальной и возвратился аппетит. После 3 дней все коровы демонстрировали отсутствие симптомов болезни. Лечение, таким образом, продолжалось лишь до 3 дней, после чего проверка молока показала, что патогенные микробы, найденные перед лечением, исчезли. Далее, в молоке не было обнаружено изменение, которые указывали бы на субклинический мастит. Ни у одной из леченых коров не было обнаружено снижение выхода молока и не наблюдалось раскрытого состояния поврежденных сосков. После 24 ч лечения димером лизоцима блокирующие вещества не были обнаружены в молоке леченых коров. Быстрое исчезновение симптомов болезни, как и полное восстановление удойности, таким образом, указывает, что составы димера лизоцима настоящего изобретения могут быть успешно использованы для лечения коровьих маститов. Эти лечения имеют конкретное экономическое значение для предотвращения маститных инфекций, вызванных бактериальными линиями стафилококков и стрептококков, которые в настоящее время стоят молочной промышленности примерно 5,4 миллиардов в год.

Пример 7. Инфекцию парвовируса собак (CPV) лечили оральным введением димера лизоцима. У двадцати семи собак различных пород и веса, воз-

растом от трех месяцев до шести лет ветеринарные хирурги обнаружили комплекс симптомов, типичный для парвовирусной инфекции. Все животные в опыте имели повышенную температуру (40-41,6°C), частые приступы обильной рвоты, множественный и характерно зловонный поносный стул, а также симптомы обезвоживания и апатии. Животные также производили впечатление сильных страданий. Лечение началось в среднем между третьим и пятым днями инфекции (в зависимости от того, как скоро владелец животного принес любимца на ветеринарную станцию). Инфицированным собакам давали димер лизоцима в дозе 1-2 мг на кг веса тела дважды в день. Животным, которые были еще способны пить, димер лизоцима вводили с питьевой водой. Животным, не способным пить, препарат давали в виде пробы в растворе физиологической соли.

Из 27 леченых собак 25 восстановили полную физическую жизнеспособность после 3-5 дней лечения. Обычно даже в течение первого дня наблюдалось заметное снижение количества испражнений и приступов рвоты, и у большинства собак эти симптомы полностью исчезли после двух дней лечения. У нескольких собак эти симптомы исчезли даже после первой дозы препарата. У всех животных не наблюдалось побочных эффектов, связанных с введением состава димера лизоцима. Эти клинические опыты демонстрируют, что состав димера лизоцима изобретения может быть успешно использован на собаках с парвовирусной инфекцией.

Пример 8. Проверяли влияние состава димера лизоцима данного изобретения на некоторые дерматологические болезни у людей. Тесты проводились на нескольких дюжинах человеческих пациентов, имеющих возраст от 15 до 35 лет и страдающих от различных болезней кожи, которые лечили ранее общепринятыми способами, но безуспешно. В этой группе были идентифицированы следующие болезни: хронический фурункулез - 2 случая, колющий сикоз (?) - 1 случай, заразное импетиго - 11 случаев, обычная боль - 22 случая, резаца - 6 случаев, варикозная язва - 12 случаев.

У некоторых пациентов из этой группы лечение предваряли тестами бактериологических культур. В большинстве случаев из собранного материала был культивирован *Staphylococcus aureus*. Лечение состояло в применении 4 раза в день мази, содержащей 4 мг димера лизоци-

ма. Конкретная предпочтительная формула мази следующая, мг:

Димер лизоцима	4,0
Ацетилстеарилоксил- силовый спирт	25,0
Жидкий парафин	10,0
Span 60	5,0
Tween 60	8,0
Пропиленгликоль	10,0
Aseptina M	0,3
Aseptina P	0,16,

дистиллированная вода в количестве, необходимом для достижения общего объема 200,0 мл.

У всех пациентов различные заболевания кожи исчезли в течение 10-12 дней, и в некоторых случаях очищение наблюдалось после 3 дней. У пациентов с хроническим фурункулезом лечение продолжалось до 4-5 недель, а те, у кого была варикозная язва, обычно требовали от 2 до 12 недель на выздоровление в зависимости от того, насколько тяжелым было состояние кожи и как долго развивалась болезнь перед лечением. Полученные в этом исследовании результаты указывают, что димер лизоцима может быть успешно использован для лечения различных болезней кожи.

Пример 9. Различные инфекционные болезни генитального района лечили с использованием димера лизоцима данного изобретения. В этих тестах лечили 9 женщин возрастом от 25 до 49 лет, у нескольких (7) пациентов был хронический кольпит, одна пациентка имела абсцесс Дугласа и одна - бартолинит. Пациентки с хроническим кольпитом получали интравагинальные суппозитории, содержащие 10 мг димера лизоцима в 2 см³ гидрофильного основания. Суппозитории применяли дважды в день в течение 7 дней. У всех пациентов наблюдалось полное исчезновение воспаления генитальной области. Кроме того, также исчезли лейкорея и другие симптомы. Пациентки с абсцессом Дугласа получали 20 мг димера лизоцима в 5 мл 0,9%-ного раствора NaCl дважды в день в течение 4 дней. Раствор вводился непосредственно в полость Дугласа. Перед каждым применением димера лизоцима из полости Дугласа отсасывали гнойное содержимое. Эти культуры продемонстрировали наличие *Streptococcus haemolyticus* и кишечной бактерии. Ненормально высокая температура тела пациентки была снижена до нормальных уровней в течение 24 ч после первого применения димера лизоцима. Болезненные симптомы также отступили в

течение этого времени. На 4-й день после второго применения состава димера лизоцима в полости Дугласа не было обнаружено гноя. В этом случае после 3 недель произошло возобновление болезни, но 2 дополнительные дозы димера лизоцима, введенные в полость Дугласа, помогли взять болезненный процесс под контроль.

Пример 10. Пациентку с бартолинитом лечили одной дозой в 20 мг димера лизоцима в 1 см³ 9%-ного NaCl, которая была введена непосредственно в нагноившуюся железу после отсасывания из нее гнойного содержимого. После 4 дней эта пациентка была полностью излечена. В течение 4 месяцев последующего наблюдения признаки возобновления болезни отсутствовали. Эти клинические тесты указывают, что димер лизоцима имеет крайне выигрышный терапевтический эффект в случае некоторых инфекционных болезней генитального района у женщин. Кроме того, представляется возможным лечить локальный абсцесс введением димера лизоцима непосредственно в полости с гнойным содержимым.

Пример 10. Изучалось влияние раствора димера лизоцима на инфицированные раны. В этой группе было 4 пациента с инфицированными послеоперационными ранами; две женщины после лапаротомии, одна - после ампутации пальца ноги из-за некроза при диабетической ангиопатии и один мужчина после ампутации нижней конечности из-за болезни Бюргера. Во всех случаях применялись влажные примочки и промывания раствором 20 мг димера лизоцима в 5 мл 0,9%-ного NaCl 4 раза в день. У пациентов с гноящимися ранами после лапаротомии полное излечение было достигнуто после 4- и 6-дневных периодов. У остальных пациентов излечение было достигнуто после 21 дня и 5 месяцев соответственно. Эти тесты указывают, что димер лизоцима может быть использован как терапевтическое средство без побочных эффектов в лечении инфицированных постоперационных ран.

Пример 11. Были проведены клинические наблюдения на пациентах с генитальным герпесом, леченых составом димера рибонуклеазы А. Группа изучения включала 5 пациентов, которые были женщинами в возрасте от 23 до 36 лет. 4 из них болели первый раз, в то время как одна из женщин болела этой болезнью третий раз. Все пациентки были в периоде образования волдырей, который обыч-

но наступает между 3 и 5-м днем болезни и сопровождается очень сильной болью в области промежности, особенно в процессе мочеиспускания. У всех пациенток мы обнаружили опухлость и инфекцию губ (половых), так же как и множественные пузырьки, наполненные мутной жидкостью, на слизистой оболочке губ и на наружной коже бедра и анальных районов. У всех пациентов паховые лимфатические узлы были увеличенными и болезненными.

Лечение включало применение мази, содержащей димер рибонуклеазы А, 4-5 раз в день на волдыри и инфицированные участки слизистой оболочки. Примененная мазь имела следующую формулу, мг:

Димер рибонуклеазы	4,0
Ацетилстеароилоксиловый спирт	25,0
Жидкий парафин	10,0
Span 60	5,0
Tween 60	8,0
Пропиленгликоль	10,0
Aseptina M	0,3
Aseptina P	0,16,

дистиллированная вода — в количестве, необходимом для достижения общего объема 200 мл.

Пациентки, получившие димерное лечение, отмечали, что после нескольких минут и по крайней мере в течение часа после первого применения мази боль существенно уменьшилась и полностью исчезла за последующие 10-20 ч. Медицинское исследование показало, что патологические изменения у 4 пациенток полностью исчезли после 3 дней лечения. У другой пациентки патологическое состояние было полностью снято после 5 дней. Ни у одной из этих пациенток новые пузырьки не образовывались после применения мази, содержащей димер панкреатической рибонуклеазы А. Приведенное выше исследование показывает, что мази, содержащие димеры настоящего изобретения, могут быть использованы в качестве успешного лечения генитального герпеса.

Пример 12. Более чем у 100 пациентов различного возраста герпес губ лечили с использованием составов настоящего изобретения. У всех этих пациентов симптомы включали опухоль района верхней губы, покраснение и множественные пузырьки, наполненные мутной жидкостью. Все пациенты жаловались на боль в коже в районах, пораженных болезнью, и дополнительно было ощущение напряжения в тканях. Лечение заключа-

лось в локальном применении 4 - 5 раз в день мази, содержащей димер панкреатической рибонуклеазы А.

Все пациенты без исключения утверждали, что боль и напряжение в тканях быстро спадали. Полное исчезновение боли следовало в течение нескольких последующих часов, как наблюдалось в случае генитального герпеса. Медицинские обследования показали, что опухоль и пузырьки исчезали в течение 2 - 3 дней. В отдельных случаях для полного очищения требовалось до 5 дней, как и для процесса полного выздоровления. Далее, наблюдалось, что у пациентов, лечение которых началось на первый день болезни, такие состояния кожи как опухание, раздражение и папулы исчезали полностью через 24 ч. Наблюдалось также, что у людей, страдающих частыми возобновлениями этой болезни, периоды между возобновлениями увеличивались и симптомы возобновления с каждым разом становились все более мягкими. Ни в одном случае не наблюдалось каких-либо побочных эффектов.

Пример 13. Клинические исследования проводились на 6 пациентах с опоясывающим герпесом, которых лечили димерным составом настоящего изобретения. В 5 случаях болезнь развивалась обычным образом и в 6-м случае были конкретные осложнения, которые будут обсуждаться ниже. Этих пациентов лечили мазью, содержащей димер панкреатической рибонуклеазы А. Лечение было начато на 3 или 4-й день болезни. Применение мази производилось 4 - 5 раз в день.

Во всех случаях боль полностью исчезала в течение первых 24 - 48 часов. Высыхание пузырьков наблюдалось после 3 - 4 дней и поэтому после этого периода было решено прекратить лечение. За последующие несколько дней кожные состояния полностью излечивались. Ни у одного из пациентов боль не сохранялась после первых 24 - 48 ч и заболевание не рецидивировало у 3 пациентов, оставшихся под наблюдением в течение более года. У одного пациента, как указано выше, было необычное клиническое развитие болезни. Женщину в возрасте 42 лет лечили от рака легких с использованием кобальтовой терапии, которая серьезно повредила ее иммунную систему. Помимо обычных симптомов опоясывающего герпеса, было обнаружено генерализованное распространение пузырьков по всему ее телу. Лечение с использова-

нием состава рибонуклеазного димера настоящего изобретения было полностью успешно для этой пациентки - женщина продемонстрировала полное исчезновение пузырьков после нескольких дней. Успешные

результаты на этой пациентке и на других членах группы демонстрируют особенную эффективность димера панкреатической рибонуклеазы А против опоясывающего герпеса, вызванного вирусами Varicella.

Т а б л и ц а 1

Тесты на цитотоксичность мономера лизоцима и димера лизоцима

Вид препарата	Конц., мг/мл	После 24 ч	После 3 дней	После 5 дней	После 7 дней
Контроль			0	0	0
Лизоцим мономер	1,0	2	2	3	3
	0,1	1	2	3	3
	0,01	0	2	2	2
	0,001	0	0	0	0
	0,0001	0	0	0	0
Лизоцим димер	1,0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0
	0,01	0	0	0	0
	0,001	0	0	0	0
	0,0001	0	0	0	0

Тесты проводились 3-кратно на культуре фибробластов GMK (почки зеленой мартышки)

- 0 - цитотоксичность = 0%
- 1 - цитотоксичность = 25%
- 2 - цитотоксичность = 50%
- 3 - цитотоксичность = 75%
- 4 - цитотоксичность = 100%

Т а б л и ц а 2

Тесты на цитотоксичность мономера панкреатической рибонуклеазы А и димера панкреатической рибонуклеазы А

Вид препарата	Конц., мг/мл	После 24 ч	После 3 дней	После 5 дней	После 7 дней
Контроль		0	0	0	0
Мономер панкреатической рибонуклеазы А	1,0	1	2	4	4
	0,1	0	1	3	4
	0,01	0	0	3	4
	0,001	0	0	2	3
	0,0001	0	1	1	2
Димер панкреатической рибонуклеазы А	1,0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0
	0,01	0	0	0	0
	0,0001	0	0	0	0

Тесты проводились 3-кратно на культуре фибробластов GMK (почки зеленой мартышки)

- 0 - цитотоксичность = 0%
- 1 - цитотоксичность = 25%
- 2 - цитотоксичность = 50%
- 3 - цитотоксичность = 75%
- 4 - цитотоксичность = 100%

Т а б л и ц а 3

Влияние димера лизоцима на линию вируса

Концентрация димера лизоцима, мг/мл	Ингибирование гемагглютинации (гемагглютининовый тест на красных кровяных клетках курицы согласно методу Така Цу)	
	Сентябрь 1987 г.	Ноябрь 1987 г.
10,0	+++	Не изучено
1,0	+++	+++
0,1	+++	+++
0,01	+++	+++
0,001 —	— ++ —	— Ингибирование отсутствует —

+++ Полное ингибирование, 1:256

++ Ограниченное ингибирование, 1:32

Т а б л и ц а 4

МИК - минимальная ингибирующая концентрация димера лизоцима в мг/мл. Бактериальные линии были культивированы на образцах, собранных от коров с маститом

Линия бактерий	Димер лизоцима в мг/мл				
	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	+	—	—
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	+	+	+	—	—
<i>Streptococcus liberis</i>	—	—	—	—	—

- = Отсутствие роста бактерий

+ = Рост бактерий

Тесты на чувствительность проведены в соответствии с общепринятыми международными принципами, рекомендованными ВОЗ.

Т а б л и ц а 5

МИК - минимальная ингибирующая концентрация димера панкреатической рибонуклеазы А в мг/мл. Бактериальные линии были культивированы на образцах, собранных на пациентах

Бактериальные линии	Димер панкреатической рибонуклеазы А, мг/мл				Димер лизоцима, мг/мл			
	2,5	5,0	10,0	20,0	2,5	5,0	10,0	20,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	—	—	—	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	—	—	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	—	—	+	+	+	+
<i>Staph. aureus</i> (Стандартная линия 209)	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>Staph. aureus</i> (Патогенная линия от пациентов)	+	+	+	+	+	—	—	—
MRSA линия № 11704	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>Staph. aureus</i> MRSA линия № 11708	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>Strept. pyogenes</i> (Патогенная линия от пациентов)	+	+	+	+	+	—	—	—

- = Отсутствие роста бактерий

+ = Рост бактерий

MRSA - устойчивый к метициллину.

Линии собраны от пациентов. Тесты на чувствительность проведены в соответствии с общепринятыми международными принципами, рекомендованными ВОЗ.

Т а б л и ц а 6

Влияние димера лизоцима на пролиферацию эритролейкемических линий клеток К-562. Клетки линии К-562 использовали в концентрации 10^5 на мл. Эффект оценивали после 24 часов культивирования при 37°C и при протоке $5\% \text{ CO}_2$

Концентрация димера лизоцима, мг/мл	Пролиферация клеток К-562 в 24-часовой культуре in vitro	
	Число клеток	Процент мертвых клеток
Контроль	190,00	2-3%
1,0	Лизис клеток	100%
0,1	107,000	95%
0,005	98,000	99%

Т а б л и ц а 7

Влияние димера панкреатической рибонуклеазы А на пролиферацию эритролейкемических линий клеток К-562. Клетки линии К-562 использовали в концентрации 10^5 на мл. Эффект оценивали после 24 часов культивирования при 37°C и при протоке $5\% \text{ CO}_2$

Концентрация димера панкреатической рибонуклеазы А, мг/мл	Пролиферация клеток К-562 в 24-часовой культуре in vitro	
	Число клеток	Процент мертвых клеток
Контроль	207,000	2-5
1,0	68,000	74
0,1	140,000	14
0,05	150,000	7

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор А.Маковська

Замовлення 502

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101